

IZS

T E R A M O

/

CENTRO DI RIFERENZA
NAZIONALE PER LE
BRUCELLOSI



Ministero della Salute

Brucellosi: valutazione dell'efficacia del vaccino RB51 in bufali gravidi sottoposti a challenge

IZSAM 04/22RC

*I risultati della ricerca corrente condotta
dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise- anno 2025*

Giusy Matteucci, DVM
Reparto Batteriologia e
sviluppo antigeni batterici

Manuela Tittarelli
Fabrizio De Massis
Flavio Sacchini

Vaccino *Brucella abortus* RB51: principali caratteristiche

...utilizzato in Italia (Caserta) e in molte zone endemiche di tutto il mondo per la profilassi della brucellosi nel bovino.



Estinti Confermati

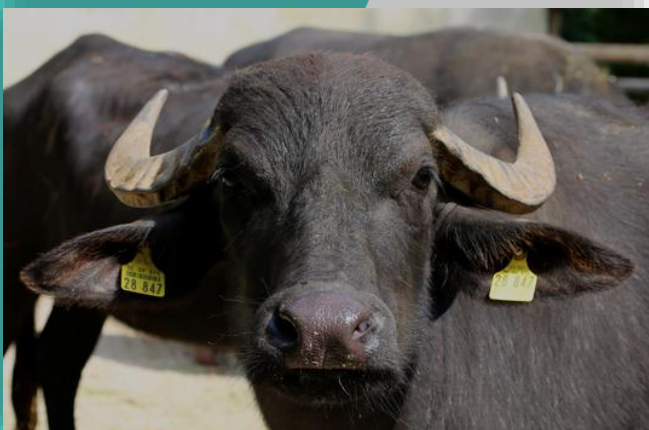


Vivo attenuato derivato da *Brucella abortus* 2308

Mancanza della catena O del LPS

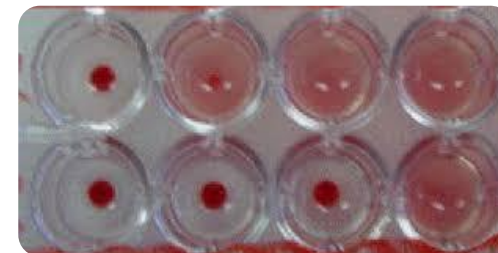
Rifampicina resistente (terapia brucellosi umana)

DIVA like: nessuna interferenza con i test ufficiali SAR/FdC → indispensabile distinguere animali vaccinati da animali infetti in zone endemiche

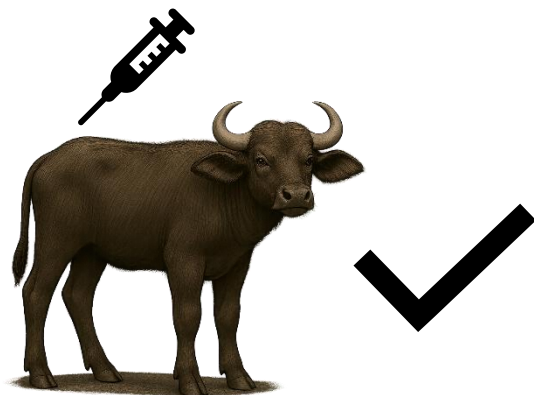


Vaccino *Brucella abortus* RB51: principali caratteristiche

- ❑ **FdC-RB51**: antigene omologo (*Ciuchini et al. 1999; Adone et al. 2001*) fondamentale per la corretta identificazione degli animali vaccinati da quelli infetti
- ❑ Uso strategico e controllato di RB51 → idoneo per ridurre la prevalenza
- ❑ Rischio di aborto ed escrezione negli animali in produzione. *Galiero et al 2009*: **il ceppo vaccinale può determinare aborto o essere eliminato attraverso il latte, con conseguente contaminazione della catena alimentare e dell'ecosistema.**
- ❑ Problema di Salute Pubblica...



Protocollo vaccinale RB51 autorizzato per la specie bufalina in Italia



Età target: 6-9 mesi

Prima vaccinazione: **dose tripla** di quella usata nei bovini ($1,0-3,4 \times 10^{10}$ CFU) – 6ml

Richiamo: stessa dose, **dopo 30 giorni*** (attualmente entro il 12° mese di età)

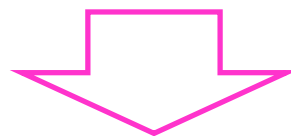


La vaccinazione non è consentita negli animali adulti
(patogenicità residua, resistente alla rifampicina...)**!!**

Assenza di dati sulla risposta immunitaria a lungo termine e la reale efficacia vaccinale in caso di infezione

.....quindi: il protocollo vaccinale autorizzato è efficace e protegge gli adulti dall'infezione?

Tassello mancante



Obiettivo

IZSAM 04/22RC

Challenge di animali vaccinati gravidi

Valutare l'efficacia del protocollo vaccinale ufficiale autorizzato per:

- *prevenire l'aborto e la natimortalità*
- *prevenire o ridurre la diffusione del patogeno con il parto e la lattazione*





M&M - Challenge: disegno sperimentale

Fase 1

Fase 2

Vaccinati:
ago-set 2020
Fase 1, n=6
Fase 2, n=4

Controlli:
Fase 1, n=2
Fase 2, n=4

Chl. I 4aa pv
Chl. II 5aa pv

Mese
gravidanza

10/2024
10/2025

6-7-8

12/2024
12/2025

9-10

01-02/2025
01-02/2026

10

02-03/2025
02-03/2026

10

02-04/2025
02-05/2026

Fecondazione

Challenge

Aborti

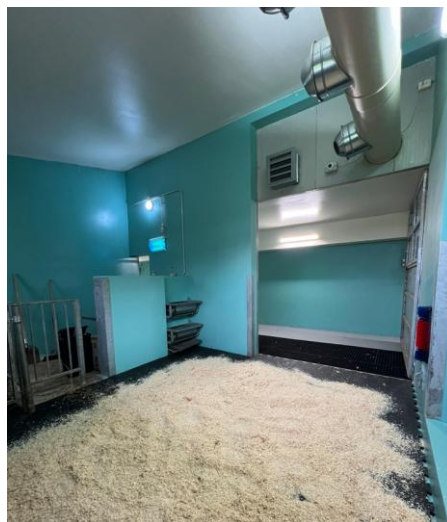
Parti (FA
marzo)

Parti (FA
aprile-
maggio)

Eutanasia
animali ~ 30
gg post-
aborto/parto

Monitoraggio 30
gg post-parto

Monitoraggio 30
gg post-parto



- a) Stabulari a contenimento biologico IZS Teramo (max. 8 animali)
- b) 2 animali / stanza
- c) 4 stanze
- d) Telecamere per controllo da remoto attive 24/7

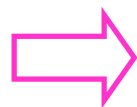


Vaccinati
RB51 n = 10
Ago-sett 2020
(6 I fase e 4 II fase)

Controlli
n = 6 (2 I fase
e 4 II fase)



Infezione congiuntivale:
100 µl/occhio (4,6-5,5x10⁸
CFU/ml) = 10⁷/capo. Ceppo *B.*
***abortus* 2308**

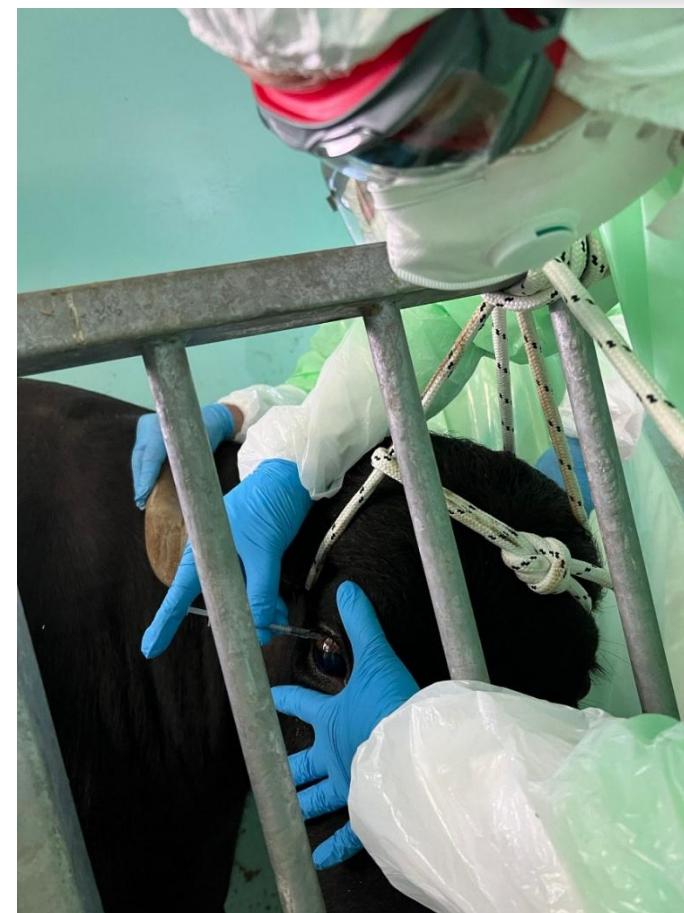


Inoculo residuo
riseminato lo stesso
giorno per controllo
titolo (**confermato**)

M&M: Challenge

Fase 1

Fase 2



M&M: Risposta immunitaria

Fase 1

Fase 2

1. PRELIEVI POST CHALLENGE



2. PRELIEVI POST PARTO (MADRE+VITELLO)



3. ESAMI SIEROLOGICI

FdC

FdC- RB51

i-ELISA

c-ELISA

i-ELISA
milk

SAR

4. IMMUNITÀ CELLULO-MEDIATA

Saggio IFN - γ



ELISA quantitativa

Kit analitico: Mabtech γ -IFN
Bovine (specifico per il bovino)



M&M: Esami microbiologici

Fase 1

Fase 2

Post challenge (To, 7, 14, 28)

- ✓ Sangue Li-ep (emocultura - batteriemia)
- ✓ Feci
- ✓ Lettiera
- ✓ Aria (campionatore portatile)



Post parto/aborto (To, 7, 14, 28, >35)

- ✓ Placenta (cotiledoni)/invogli
- ✓ Aborto
- ✓ Lettiera (*!)
- ✓ Aria
- ✓ Colostro/Latte
- ✓ Tamponi vaginali
- ✓ Sangue (madri/vitelli)

RISULTATI CLINICI

Fase 1



6 vaccinati

- 6 vitelli vitali
- 1 parto distocico risolto, vitello normale
- Secondamenti rapidi

2 controlli

- 1 aborto (animale infettato al 7° mese di gestazione) con ritenzione placentare ed endometrite purulenta
- 1 vitello vitale *



* In corso di focolaio l'aborto si verifica solo in un ridotto numero di animali.

Resistenza naturale di alcuni individui?

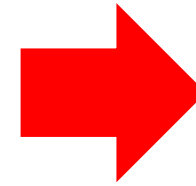
(Nramp1BB genotipo, Borriello et al. 2006, Infect. Immun. 74(4):2115-2120)

RISULTATI ESAMI MICROBIOLOGICI post-challenge

Fase 1

Fase 2

Feci (ampolla rettale) 
Sangue (emocoltura) 
Lettiera 
Aria (memb. filtranti) 



**No isolamento o
presenza di
Brucella (PCR-RT)**

*A seguito di infezione per via congiuntivale non si ha rilascio di
Brucella nell'ambiente per le 4 settimane post-infezione.*

Urine non testate ma emocolture negative

RISULTATI: ABORTO

Fase 1

Aborto 60 giorni post-infezione (9° mese), animale infettato al 7° mese di gestazione.



Matrice	UFC/gr
Placenta	$2,6^{10^6}$
Cervello	$9,5^{10^4}$
Abomaso	$4,8^{10^5}$
Polmone	$1,6^{10^5}$
Milza	$1,4^{10^5}$
Lettiera	$4,5^{10^8}$
Aria	Neg
Colostro	$>11000 \text{ MPN/ml}$



RISULTATI POST-ABORTO

Fase 1

Aborto 60 giorni post infezione (9° mese), animale infettato al 7° mese di gestazione.



○ **Latte:** la quantificazione della carica mostra un picco iniziale 12 gg post aborto (p.a.) con PCR-RT positiva e valori pari a 46 MPN/ml; 19, 23 e 30 gg p.a. si rileva positività alla PCR-RT, ma la carica non è risultata significativa



○ **Tamponi vaginali:** positivi alla PCR-RT il giorno dell'aborto e poi 5 gg p.a., e 9 gg p.a.

RISULTATI PARTI E POST-PARTI

Fase 1



- ❑ Le restanti 7 bufale hanno portato a termine la gravidanza, risultando negative per tutte le matrici prelevate....eccetto:

*Caso specifico Bufala **vaccinata!!!***

- ❖ Latte: Positivo alla PCR-RT 18 giorni post-parto (p.p.).
- ❖ Linfonodi (LL) retrofaringei (50 giorni p.p.): positivi alla PCR-RT e all'isolamento con una carica pari a 160 UFC/g

- ❑ Tra queste è inclusa la seconda bufala del gruppo controllo → N.B. ipotesi di una possibile **resistenza naturale** all'infezione.

RISULTATI CLINICI

Fase 2

4 vaccinati

- 2 vitelli vitali, 2 vitelli prematuri (disvitali)
- Secondamenti rapidi



4 controlli

- 3 aborti (animali infettati al 6°-7° mese di gestazione) con ritenzione placentare e 1 caso di endometrite purulenta
- 1 vitello vitale *



* NB: Resistenza naturale di alcuni individui?



NAZIONALE PER LE
BRUCELLOSI

RISULTATI ABORTI

Fase 2

Aborti nelle bufale controllo: 49-60 giorni post infezione, challenge tra il 5° e il 6° mese di gestazione

Abo1: 3/12/2025

Matrice	UFC/gr
Placenta	$1,6^{10^7}$
Cervello	$3,9^{10^4}$
Abomaso	Neg
Polmone	$3,4^{10^4}$
Milza	$7,8^{10^4}$
Lettiera	$4,8^{10^6}$
Aria	Neg
Colostro	9 MPN/ml



Abo2: 8/12/2025

Matrice	UFC/gr
Placenta	$2,7^{10^6}$
Cervello	Neg
Abomaso	110
Polmone	Neg
Milza	Pos (PCR-RT)
Lettiera	$1,3^{10^6}$
Aria	Neg
Colostro	Neg



Abo3: 14/12/2025

Matrice	UFC/gr
Placenta	$7,1^{10^7}$
Cervello	$6,6^{10^4}$
Abomaso	2^{10^7}
Polmone	$1,3^{10^6}$
Milza	5^{10^4}
Lettiera	$3,5^{10^6}$
Aria	Neg
Colostro	Neg





RISULTATI POST-ABORTO

Fase 2

- ❑ Latte: Escrezione intermittente in tutte e tre le bufale (positività a PCR-RT e isolamento con cariche non particolarmente elevate):
 - ❖ Abo1: PCR-RT positiva 6, 15 e 28 gg p.a.; isolamento positivo 6 e 25 gg p.a.
 - ❖ Abo2: PCR-RT positiva 8, 10, 14, 18, 24, 27, 34 e 37 gg p.a.; isolamento positivo 1 e 30 gg p.a.
 - ❖ Abo3: PCR-RT e isolamento positivi 5 gg p.a.

RISULTATI PARTI E POST-PARTI

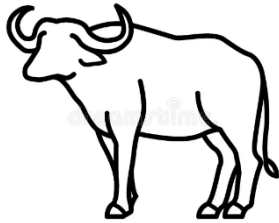
Fase 2

❑ Tamponi vaginali:



- ❖ Abo1: PCR-RT e isolamento positivi il giorno dell'aborto e 2, 8, 13 e 15 gg p.a.
- ❖ Abo2: PCR-RT positiva il giorno dell'aborto e 8 gg p.a.
- ❖ Abo3: Isolamento positivo il giorno dell'aborto e 1 gg p.a.; PCR-RT positiva il giorno dell'aborto, 1 e 12 gg p.a.

❑ Organi:



- ❖ Abo1 (40 gg p.a.): LL retrofaringei <40 UFC/g, LL sopramammari 4200 UFC/g, LL iliaci 100 UFC/g.
- ❖ Abo2 (40 gg p.a.): LL sopramammari 2500 UFC/g.
- ❖ Abo3 (**87 gg p.a.**): Tutto negativo. Soppressa in ritardo per motivi di benessere.

RISULTATI PARTI E POST-PARTI

Fase 2

Gravidanze portate a termine (3/5)

- 2 vaccinate → matrici tutte negative
- 1 bufala controllo → matrici tutte negative *



Parti prematuri (2/5):

- 1 bufala vaccinata → matrici tutte negative
- 1 bufala vaccinata →



** NB: Resistenza naturale di
alcuni individui?*

RISULTATI PARTI E POST-PARTI

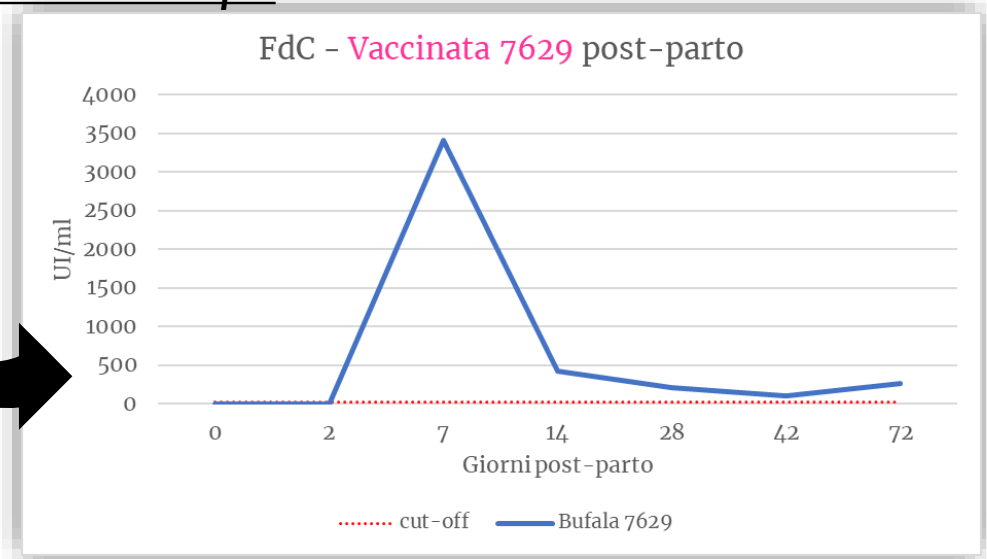
Fase 2



Focus: 1 bufala vaccinata, sottoposta a challenge 5aa p.v.

- La bufala ha avuto un parto prematuro con vitello disvitale.
- Nessun riscontro microbiologico per Brucella dagli invogli fetali, né dal vitello.
- **!!! positività da tampone vaginale a partire dal 2° g. p.p. fino al 17° g. pp.** sia all'isolamento sia alla PCR-RT, con sieroconversione e titoli anticorpali che decrescono rapidamente ma permangono nel tempo.

Questo indica che con l'immunodepressione post parto la Brucella si è attivata ma successivamente è stata controllata



Studio di vitalità di *Brucella* nella lettiera (aborti)

Matrice	UFC/gr
Placenta	$2,6 \times 10^6$
Cervello	$9,5 \times 10^4$
Abomaso	$4,8 \times 10^5$
Polmone	$1,6 \times 10^5$
Milza	$1,4 \times 10^5$
Lettiera	$4,5 \times 10^8$
Aria	Neg

Matrice	UFC/gr
Placenta	$1,6 \times 10^7$
Cervello	$3,9 \times 10^4$
Abomaso	Neg
Polmone	$3,4 \times 10^4$
Milza	$7,8 \times 10^4$
Lettiera	$4,8 \times 10^6$
Aria	Neg

Matrice	UFC/gr
Placenta	$2,7 \times 10^6$
Cervello	Neg
Abomaso	110
Polmone	Neg
Milza	Pos
Lettiera	$1,3 \times 10^6$
Aria	Neg

Matrice	UFC/gr
Placenta	$7,1 \times 10^7$
Cervello	$6,6 \times 10^4$
Abomaso	2×10^7
Polmone	$1,3 \times 10^6$
Milza	5×10^4
Lettiera	$3,5 \times 10^6$
Aria	Neg

Studio di vitalità della brucella nella matrice lettiera (aborti)

Fase 2



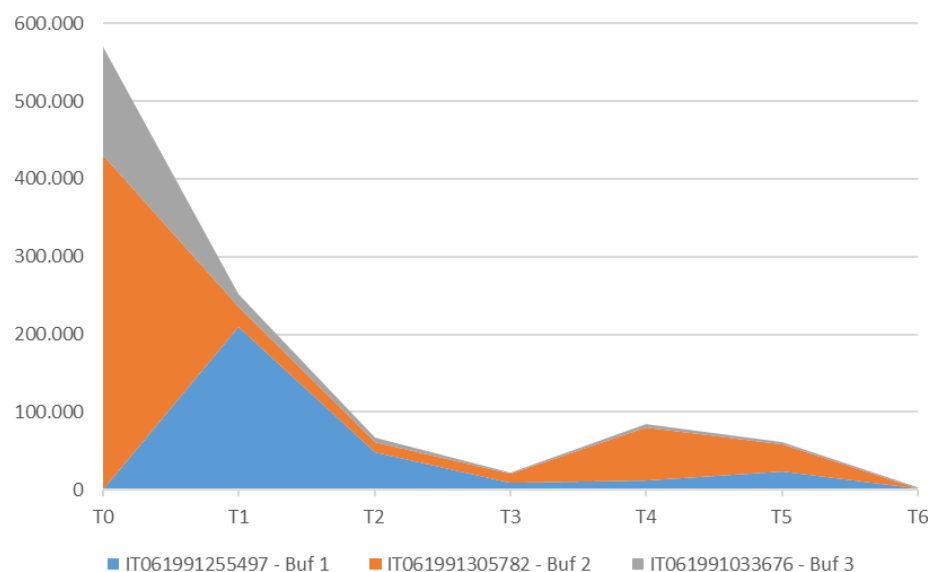
- ✓ **Raccolta e stoccaggio:** i campioni sono stati stoccati all'interno delle stanze dello stabulario in contenitori semi-chiusi, mantenuti a temperatura ambiente e costantemente esposti alla luce naturale.
- ✓ **Campionamento:** i prelievi sono stati eseguiti secondo un principio di randomizzazione, evitando di limitare la raccolta alle sole aree sature di liquido amniotico, al fine di ottenere un campione rappresentativo dell'ambiente.
- ✓ **Analisi:** la lettiera è stata sottoposta ad analisi colturale per l'isolamento e la conta batterica a intervalli di tempo predefiniti espressi in giorni post-aborto (p.a.) secondo il seguente schema cronologico:

Tempi	Giorni p.a.
T0	0
T1	7
T2	30
T3	60
T4	90
T5	120
T6	150

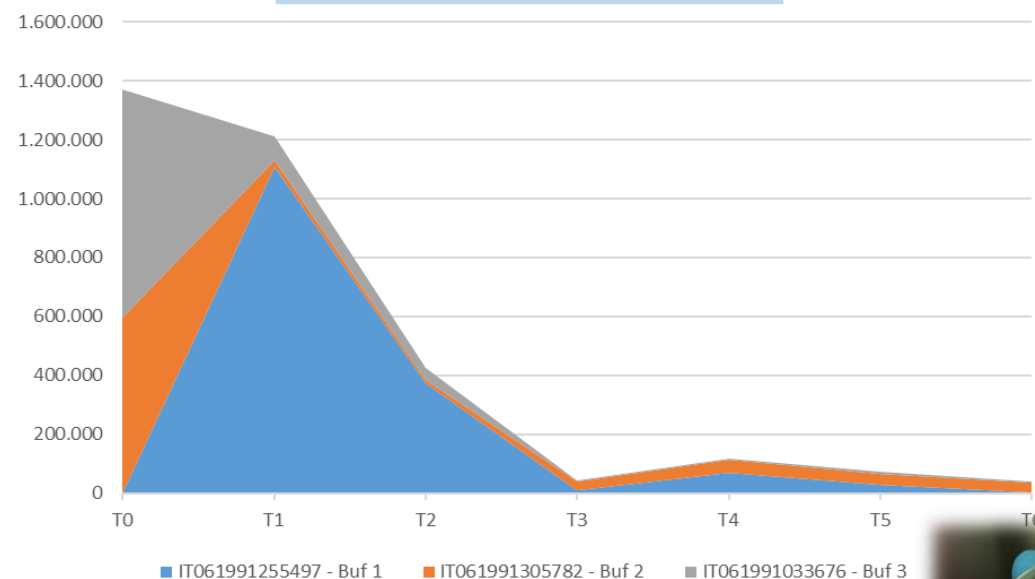
Studio di vitalità della brucella nella matrice lettiera (aborti)

Fase 2

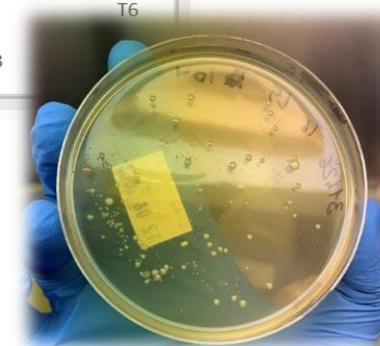
Mediana di ufc/mg per lettiera x tempo



Media di ufc/mg per lettiera x tempo



Sopravvive e *persiste* nel tempo...



Il protocollo vaccinale autorizzato in Italia con RB51...

1. Conferisce un'immunità che permane per **almeno 4 anni** dalla vaccinazione.
2. Protegge gli animali dalla sintomatologia **ma non dall'infezione** (positività negli animali vaccinati, sia a PCR-RT sia a isolamento, ma con cariche non significative).
3. Previene / riduce il rilascio del patogeno a seguito di infezione (parto, latte), riducendo la pressione infettiva in corso di focolaio. Gli animali vaccinati si infettano, **ma non amplificano la trasmissione**.

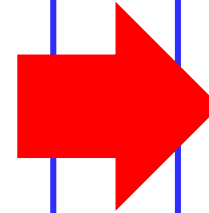


Take home messages

Necessità di una strategia integrata:
vaccino + biosicurezza + formazione

Prevenzione:
Conoscere le categorie ad alto rischio

Ruolo dell'allevatore e del Veterinario LP:
fondamentale per un corretto
management dell'azienda

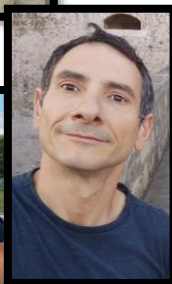


*L'eradicazione definitiva impone
un'evoluzione culturale,
integrando le competenze di
allevatori, veterinari liberi
professionisti e istituzioni
sanitarie.*





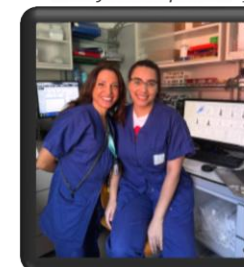
CEN
NAZI
BRU



- IZSAM 09/13 RC
- IZSAM 09/19 RC
- IZSAM 04/22 RC



Dott.ssa Maysa Serpa Gonçalves



Dott.ssa Giulia Cugini
(dottoranda UNITE)

